



(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :  C12Q 1/68, G01N 33/53	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/63109  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. Dezember 1999 (09.12.99)
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT99/00139</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 2. Juni 1999 (02.06.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: A 963/98 4. Juni 1998 (04.06.98) AT</p> <p>(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): BAXTER AKTIENGESELLSCHAFT [AT/AT]; Industriestrasse 67, A-1221 Wien (AT).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): ZIMMERMANN, Klaus [DE/AT]; Harlacherweg 2/2/19, A-1220 Wien (AT). TURECEK, Peter [AT/AT]; Hauptstrasse 59g, Weidling, A-3400 Klosterneuburg (AT). SCHWARZ, Hans-Peter [AT/AT]; Schindlergasse 32, A-1180 Wien (AT). SIEKMANN, Jürgen [DE/AT]; Gerasdorfer Strasse 153/209, A-1210 Wien (AT).</p> <p>(74) Anwälte: SONN, Helmut usw.; Riemergasse 14, A-1010 Wien (AT).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>
<p>(54) Title: METHOD FOR DETERMINING ANTIGENS</p> <p>(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG VON ANTIGENEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to a method for determining antigens in a sample by amplifying a nucleic acid, said nucleic acid being bonded to a ligand which is specific to the antigen. The determination is carried out in the presence of at least one internal standard.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Beschrieben wird ein Verfahren zur Bestimmung von Antigenen in einer Probe durch Amplifizieren einer Nukleinsäure, die an einen für die Antigene spezifischen Liganden gebunden ist, wobei die Bestimmung in Anwesenheit mindestens eines internen Standards durchgeführt wird.</p>		
<p><b>Legend:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>E Standard-Antigen</li> <li>F Spezifisches Antigen</li> <li>IPOS 1</li> <li>IPO 1</li> <li>G Interne Standard-Nukleinsäure</li> <li>H Ziel-Nukleinsäure</li> </ul> <p><b>Labels in Diagram:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>B IMMUNASSAY</li> <li>C PCR</li> <li>D AMPLIFICATIONS-PRODUKT</li> <li>E Standard-Antigen</li> <li>F Spezifisches Antigen</li> <li>G Interne Standard-Nukleinsäure</li> <li>H Ziel-Nukleinsäure</li> <li>IPOS 1</li> <li>IPO 1</li> <li>A Gel Electrophoresis</li> <li>C Detection</li> <li>D Product of Amplification</li> <li>E Standard Antigen</li> <li>F Specific Antigen</li> <li>G Internal Standard Nucleic Acid</li> <li>H Target Nucleic Acid</li> </ul>		

***LEDIGLICH ZUR INFORMATION***

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

- 1 -

### Verfahren zur Bestimmung von Antigenen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von Antigenen in einer Probe durch Amplifizieren einer Nukleinsäure, die an das zu bestimmende Antigen gebunden wird.

Die Detektion von spezifischen Antigenen ist vor allem in niedrigen Konzentrationsbereichen schwierig. Oft müssen aber die zu detektierenden Antigene gerade in niedrigen Konzentrationsbereichen oder Mengen bestimmt werden, um wichtige Aussagen, beispielsweise zu Krankheitsbildern, biologischen Kontaminationen, physiologischen Werten von ausgewählten Proteinen, etc., zu erhalten.

Antigene werden üblicherweise durch Antikörpertests, beispielsweise mittels ELISA, bestimmt. Dabei wird das zu bestimmende Antigen durch Bindung an einen für das Antigen spezifischen Antikörper detektiert. Das Ausmaß an gebundenem Antikörper/Antigen wird dann üblicherweise durch eine bewährte Nachweismethode, wie z.B. Radioaktivität, Fluoreszenz, Färbungsreaktion, etc., vorzugsweise unter Verwendung von sekundären Antikörpern, bestimmt.

Jedoch haben sogar die empfindlichsten ELISA-Tests, z.B. solche, die mit radioaktiven Nachweismethoden durchgeführt werden, eine Nachweisgrenze, die in manchen Fällen um Zehnerpotenzen zu hoch ist, um ein brauchbares Ergebnis zu liefern. Weiters gibt es Proteine oder Pathogene, die mit herkömmlichen Antikörper/Antigen-Bestimmungsmethoden aufgrund der spezifischen Natur des Antigens nicht oder nur unbefriedigend bestimmt werden können.

Ein Beispiel für ein derartiges Pathogen ist das für Scrapie verantwortliche Antigen. Scrapie wurde zum ersten Mal vor etwa 250 Jahren in Schafen entdeckt. In den letzten Jahren wurden mit Scrapie verwandte Krankheiten auch bei anderen Tieren und auch im Menschen als übertragbare spongiforme Enzephalopathie (TSE, transmissible spongiform encephalopathies) beschrieben. Als Ursache dieser Krankheiten werden Prionen angenommen. Prionen-Erkrankungen sind mit herkömmlichen Antigen/Antikörpertests nicht befriedigend diagnostizierbar.

- 2 -

Ein Prionenprotein ist entweder nicht infektiös, man spricht dann von einem PrP<sup>c</sup>, oder aber infektiös, dann spricht man von einem PrP<sup>sc</sup>. Das nicht infektiöse Prionenprotein PrP<sup>c</sup> ist ein ubiquitäres zelluläres Protein, welches durch eine Konformationsänderung zum infektiösen Prionenprotein PrP<sup>sc</sup> wird. Üblicherweise wird zur Unterscheidung des Prionen-Proteins vom infektiösen Prionenprotein ein Proteinase-K-Verdau mit einem anschließenden Western Blot durchgeführt, wobei sich das infektiöse Prionenprotein PrP<sup>sc</sup> als teilweise resistent gegenüber dem Proteinase-K-Verdau erweist. Darüberhinaus beschreiben Korth et al. (Nature 390 (1998), 74-77) ein Verfahren zur Herstellung von Antikörpern, die spezifisch entweder das „normale“, nicht infektiöse Prionenprotein erkennen, oder die spezifisch das infektiöse Prionenprotein erkennen.

Die Prionen verursachen meist progressive Erkrankungen des Zentralnervensystems (spongiforme Enzephalopathien), beispielsweise Scrapie im Schaf, Kuru, RSE im Rind sowie die Creutzfeld-Jakob-Krankheit (CJD), das Gerstmann-Sträussler-Syndrom (GSS) und die fatale familiäre Insomnia (FFI). Die Prionen zeichnen sich durch besondere physikochemische und biologische Eigenschaften gegenüber Viren und Bakterien aus: hohe Resistenz gegenüber Inaktivierung durch Formaldehyd, Nukleaseen, Hitze, UV- und ionisierende Strahlen, und sind nicht als Virion oder Zelle im Elektronenmikroskop erkennbar. Sie sind insensitiv gegenüber Interferonen, zeigen keine Interferenz mit Viren und außerdem konnte bisher keine Nukleinsäure nachgewiesen werden.

In Großbritannien trat in letzter Zeit vermehrt eine Variante von CJD mit neuen neuropathologischen Merkmalen auf (nvCJD). Es konnte gezeigt werden, daß diese nvCJD durch Übertragung von BSE vom Rind zum Menschen durch die Konsumation von kontaminierten Rinderinnereien verursacht wurde. Daher wird oftmals gefordert, biologische Materialien, die zur Herstellung von therapeutischen Zusammensetzungen herangezogen werden, wie z.B. Körpersäfte, Blut, Plasma, Plasmafraktionen und Serum, Gewebe und Zellkulturnen, auf Prionen zu untersuchen.

Dieser Untersuchung der biologischen Materialien und dem an-

- 3 -

schließenden Ausschluß kontaminiert Materialien kommt daher immer mehr an Bedeutung zu, da Prionen sich als überaus resistent gegenüber herkömmlichen Inaktivierungsverfahren, wie z.B. Hitzebehandlung oder Behandlung mit UV, erwiesen haben.

Herkömmliche Prionentests, wie z.B. Western Blot unter Verwendung von spezifischen Antikörpern, haben eine ungenügende Sensitivität, um Prionenprotein effektiv bestimmen zu können. In der WO 97 37 227 ist ein immunhistochemischer Test zur Bestimmung von Prionen in Geweben beschrieben. Mittels dieser Methode kann eventuell in histologischen Schnitten aus infizierten Gewebeteilen das veränderte Prionenprotein ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) bestimmt werden. Diese Methode ist allerdings wenig zuverlässig und insbesondere für die Untersuchung von Blut und Blutprodukten ungeeignet.

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur in-vitro-Amplifikation spezifischer einzelsträngiger oder doppelsträngiger DNA-Fragmente. Durch eine wiederholte Hitzedenaturierung der DNA-Doppelstränge, Anhybridisieren der Primer und Verlängerung durch DNA-Polymerase kommt es zu einer enormen Anreicherung eines doppelsträngigen DNA-Fragments. Nach 20 Zyklen erhält man ausgehend von einem DNA-Molekül infolge einer exponentiellen Kettenreaktion ca. 1 Million Kopien (siehe EP 0 200 362 und EP 0 201 184). Mittels dieser Methode können allerdings nur Nukleinsäuren detektiert werden, für Proteine ist dieses Verfahren ungeeignet.

Ein verbessertes Verfahren wird in der EP 0 714 988 beschrieben. Dabei wird der zu bestimmenden Probe ein Standard zugesetzt, um die mittels PCR bestimmte DNA auch quantifizieren zu können.

In Sano et al. (Science 258 (1992), 120-122) ist eine Kombination von ELISA mit PCR als Immuno-PCR beschrieben. Dabei wird ein Verbindungsmolekül (Linker) mit bispezifischer Bindungsaaffinität für DNA und Antikörper, z.B. ein chimäres Molekül aus Streptavidin für biotinylierte DNA und Protein A für Immunglobulin G, benutzt, um ein bestimmtes DNA-Molekül (Marker) unspezifisch an einen Antigen-Antikörper-Komplex zu binden, so daß ein Antigen-Antikörper-Linker-DNA-Komplex entsteht. Der gebundene DNA-Marker kann nun mittels entsprechender Primer in einer PCR

- 4 -

amplifiziert werden. Der Nachweis des PCR-Produkts zeigt die Präsenz der Antigene an.

Die markierten DNA-Antikörper-Komplexe werden *in situ* im Reaktionsgemisch zusammengesetzt; dadurch kann es zu verschiedener Stöchiometrie in der Zusammensetzung und Bindung der DNA kommen. Zusätzliche Schritte für die Zugabe von biotinylierten Reagenzien und Bindungsproteinen sowie zahlreiche Waschschritte sind erforderlich, um überschüssige Reagenzien zu entfernen. Durch die vielen Verfahrensschritte wird dieses Verfahren kompliziert und zeitaufwendig, um es in der Routineanalyse anwenden zu können. Weiters ist diese Methode für komplexe Gemische von verschiedenen Antigenen nicht geeignet.

Hendrickson et al. (Nucl. Acids Res. 23(3) (1995), 522-529) beschreiben daher einen verbesserten Immunassay zur gleichzeitigen Bestimmung von verschiedenen Analyten. Dabei wurden die Antikörper und die DNA, in diesem Fall ein einzelsträngiges Oligonukleotid, separat aktiviert und in einer spontanen Reaktion direkt aneinander gekoppelt. Von Hendrickson et al. wird die gleichzeitige Detektion von drei unterschiedlichen Analyten mittels Immuno-PCR beschrieben. Die DNA-markierten Antikörper, die an das entsprechende Antigen gebunden sind, werden mittels PCR amplifiziert und bestimmt.

Bei diesen Immuno-PCR-Methoden besteht jedoch - wie allgemein bei der PCR an sich - stets das Risiko von fälschlicherweise negativen Resultaten, d.h. mit der Detektionsreaktion kann ein spezifisches Antigen nicht nachgewiesen werden, obwohl dieses spezifische Antigen tatsächlich in der Probe enthalten ist. Dies kann vor allem beim Nachweis von Pathogenen in Proben, welche zur Weiterverarbeitung zu Arzneimitteln, die an Menschen verabreicht werden sollen, eingesetzt werden, fatale Folgen haben: dadurch könnten Proben aufgrund von fälschlicherweise negativen Resultaten zur Weiterverarbeitung ausgewählt werden, obwohl diese Proben Pathogene enthalten.

Um die damit verbundene Gefahr der Verwendung von möglicherweise infektiösen Ausgangsmaterialien bei der Herstellung von pharmazeutischen Präparaten auszuschließen, ist man bestrebt, falsch-

- 5 -

negative Resultate zu eliminieren.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein zuverlässiges und sensitivs Verfahren zur Bestimmung von Antigenen zur Verfügung zu stellen, mit welchem vor allem falsch-negative Ergebnisse von vornherein ausgeschlossen werden können.

Die erfindungsgemäße Aufgabe wird durch ein Verfahren zur Bestimmung von Antigenen durch Amplifizieren einer Nukleinsäure (Ziel-Nukleinsäure), die an einem für die Antigene spezifischen Liganden gebunden ist, gelöst, welches sich dadurch auszeichnet, daß die Bestimmung in Anwesenheit mindestens eines internen Standards durchgeführt wird.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können Antigen-Bestimmungen mittels Immun-Amplifikationsreaktionen auf elegante Weise überwacht und kontrolliert werden. Vor allem aber können durch das erfindungsgemäße Verfahren falsch-negative Ergebnisse verlässlich ausgeschlossen werden. Weiters ist durch die Verwendung von internen Standards auch der Erhalt einer quantitativen Vergleichsgröße für die Antigenbestimmung in der Probe möglich, vor allem, wenn mehr als ein Standard verwendet wird. Im Routinebetrieb wird es aber in der Regel nicht erforderlich sein, mehr als einen Standard zu verwenden, insbesondere, wenn mit der Verwendung eines Standards lediglich falsch-negative Ergebnisse ausgeschlossen werden sollen.

Bevorzugterweise wird erfindungsgemäß eine an einem Liganden gebundene Nukleinsäure als Standard eingesetzt (Standard-Nukleinsäure). Dabei kommen besonders bevorzugt Standard-Nukleinsäuren zum Einsatz, die sich von der Nukleinsäure, mit welcher das (Ziel-)Antigen bestimmt wird (Ziel-Nukleinsäure), zumindest in einem detektierbaren Merkmal unterscheidet.

Erfindungsgemäß werden dann sowohl die Standard-Nukleinsäure als auch die Ziel-Nukleinsäure amplifiziert und die amplifizierten Nukleinsäuren untersucht.

Beispiele für (Gen-)Amplifikationsverfahren sind neben der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) die reverse Transkriptase-PCR (RT-

- 6 -

PCR), die Ligase-Chain-Reaction (LCR) sowie die nucleic acid sequence based amplification (NASBA).

Um die Proben besser charakterisieren zu können, wird beim "Taqman Assay" die Polymerase-Kettenreaktion mit einer Hybridisierung der Zielsequenz mit einer markierten Probe kombiniert (Holland et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 88 (1991), 7276-7280).

Die Standard-Nukleinsäure kann vorzugsweise eine Länge von mindestens 70 Nukleinsäuren aufweisen. Bevorzugt wird eine Länge von > 100 bis mehrere hundert Nukleinsäuren gewählt.

Die Ziel-Nukleinsäure ist an den Liganden, spezifisch für das zu bestimmende Antigen, gebunden. Als Liganden werden bevorzugt Antikörper, die spezifisch für das zu bestimmende Antigen sind, verwendet. Es können aber auch Affinitäts-Liganden eingesetzt werden, wie z.B. Peptide, die spezifisch an das Antigen binden. Die Standard-Nukleinsäure unterscheidet sich üblicherweise in wenigstens einem detektierbarem Merkmal von der Ziel-Nukleinsäure, wird aber vorzugsweise mit Hilfe der gleichen Mitteln, wie Primer, amplifiziert. Als bevorzugt haben sich Standard-Nukleinsäuren erwiesen, die eine andere Größe als die zu bestimmende Nukleinsäure oder eine unikre Restriktionsschnittstelle aufweisen, da hierbei das Ergebnis durch einfache Gelelektrophorese ausgewertet werden kann. Bevorzugte Standards unterscheiden sich von der zu bestimmenden Nukleinsäure in 1% bis 20% ihrer Länge bzw. durch mindestens 3, maximal 50 Nukleotide, wobei eine Standard-Nukleinsäure, die länger ist als die Ziel-Nukleinsäure als "plus" ("+)-Standard bezeichnet wird, und eine Standard-Nukleinsäure, die kleiner ist als die Ziel-Nukleinsäure als "minus" ("")-Standard bezeichnet wird. Die genaue Sequenz der Standard-Nukleinsäure sollte natürlich bekannt sein.

Sowohl die Nukleinsäure für den internen Standard als auch die Nukleinsäure, die an den Liganden, spezifisch für das zu bestimmende Antigen, gebunden wird, kann entweder als doppelsträngige oder als einzelsträngige Nukleinsäure eingesetzt werden. Bevorzugterweise wird einzelsträngige DNA mit einer endständigen Aminogruppe zum chemischen Crosslinking mit dem spezifischen Liganden gewählt. Bevorzugt werden hierbei Nukleinsäuren mit einer

- 7 -

Länge von 70 - 120 Basenpaaren verwendet.

Der interne Standard kann auch als Verbund der Standard-Nukleinsäure mit einem Liganden, spezifisch für ein Standard-Antigen, zur Verfügung gestellt werden. Der interne Standard kann nun entweder unmittelbar an dem spezifischen Liganden gebunden werden oder aber auch mittels eines Verbindungsmoleküls (Linker), welches auf der einen Seite eine DNA-Bindungsstelle aufweist, beispielsweise Streptavidin, und auf der anderen Seite einen spezifischen Liganden, der gegen ein Antigen (Standard-Antigen) gerichtet ist, die Verbindung zwischen dem spezifischen Liganden und der DNA hergestellt werden. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die DNA unmittelbar durch chemische Bindung an den Liganden gebunden, beispielsweise mittels Affinitätsbindung oder kovalenter Bindung.

Als Liganden für den internen Standard und/oder für das zu bestimmende Antigen können Peptide oder monospezifische Antikörper, sowohl monoklonale oder polyklonale, aber auch chimäre, rekombinante beziehungsweise humanisierte Antikörper verwendet werden. Die Liganden, die an die Standard-Nukleinsäure gebunden sind, können auch spezifisch gegen das zu bestimmende Antigen gerichtet sein, um kompetitiv mit den Ziel-Liganden spezifisch für das zu bestimmenden Antigen zu wirken. Dabei können auch polyspezifische Antikörper eingesetzt werden, die das Standard-Antigen erkennen. Liganden, die spezifisch für das zu bestimmenden Antigen sind, sind bevorzugterweise Antikörper, die zur Bestimmung von modifizierten Proteinen und Prionenproteinen geeignet sind. Gleichfalls können für andere Zwecke auch Liganden spezifisch für die zu bestimmenden Antigene ausgewählt werden, z.B. aus der Gruppe von viralen, bakteriellen oder Humanproteinen. Bevorzugterweise werden bei der Bestimmung von Prionen spezifische Antikörper für ein Prionenprotein verwendet.

Die bei der Amplifizierung verwendeten Primer können vorzugsweise Marker enthalten, welche die Nachweisgrenze zur Bestimmung der amplifizierten Nukleinsäure noch weiter erhöhen, beispielsweise fluoreszierende oder radioaktive Gruppen oder chemische Gruppen, die mit affinen Proteinen und nachgeschalteten Detektionsreaktionen detektiert werden können (z.B. Biotin-Avidin, DIG-

- 8 -

Markierung etc.), wobei Primer mit fluoreszierenden Gruppen besonders bevorzugt sind.

Die Detektion der amplifizierten Nukleinsäuren kann auf unterschiedlichste Weise erfolgen, meist jedoch ist ein Schritt vorzusehen, bei welchem die amplifizierte Standard-Nukleinsäure von der amplifizierten Ziel-Nukleinsäure getrennt wird, und die getrennten Nukleinsäuren separat bestimmt werden. Vorzugsweise besteht dieser Trennungsschritt in einer Gelelektrophorese oder in einem chromatographischen Verfahren. Durch Bestimmung des Verhältnisses der Menge an Ziel-Nukleinsäure zur bekannten Menge einer Standard-Nukleinsäure kann zusätzlich die Quantifizierung des Antigens ermöglicht werden.

Zu den Antigenen, die mittels dem erfindungsgemäßen Verfahren bestimmt werden können, gehören Antigene aus biologischen Proben von Säugetieren, wie Körperflüssigkeiten, z.B. Plasma, Blut, Blutzellen und Serum, Gewebe, aber auch Antigene aus eukaryontischen Zellkulturen. Bevorzugt werden erfindungsgemäß Antigene von Pathogenen oder auch Marker-Antigene für Pathogene bestimmt. Zu diesen Antigenen zählen virale Antigene, bakterielle Antigene und insbesondere Antigene, für die bislang keine Routine-Nachweismethode zur Verfügung stand, wie beispielsweise modifizierte (z.B. konformationsgeänderte) Proteine, wie Prionen, die im Zusammenhang mit infektiösen Krankheiten des Zentralnervensystems, wie CJD und BSE, oder anderen Erregern von TSE, stehen. Solche modifizierten Proteine können durch induzierte Konformationsänderungen erhalten werden. Diese Konformationsänderung an Proteinen, wie gegebenenfalls rekombinante PrP<sub>c</sub>, kann durch vorhergangene Inkubation mit infektiösen Molekülen (wie PrP<sub>Sc</sub>) hervorgerufen werden, welche dann z.B. durch radioaktive Marker detektierbar sind. Eine derartige Konformationsänderung von modifizierten Prionenmolekülen wurde bereits von Kocisko et al. (Nature 370 (1994), 471-474) beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden ein oder mehrere der Antigene von Humanpathogenen, wie HIV, Hepatitisviren, darunter HAV, HBV, HCV, HGV und Parvoviren, bestimmt. Die zu bestimmenden Antigene können in einer gereinigten proteinhaltigen Präparation, z.B. einer Plasmafraktion, einer Präparation eines gerei-

- 9 -

nigten Plasmaproteins, bzw. einem biologischen Arzneimittel, bestimmt werden. Sie können aber auch in Plasmapools oder anderen komplexen Gemischen bzw. in den genannten biologischen Proben zuverlässig bestimmt werden. Eine Qualitätssicherung wie in der WO96/35437 beschrieben, kann auch mit dem erfindungsgemäßen Verfahren entsprechend adaptiert durchgeführt werden.

Der entsprechende interne Standard kann vor der Probenaufbereitung zugesetzt werden, während allen Zwischenstufen oder erst unmittelbar vor der Amplifikationsreaktion. In einer bevorzugten Ausführungsform wird der Standard von Anfang an als ungebundene Nukleinsäure bzw. als gebundene Nukleinsäure nach der Immunkomplexbildung zugesetzt. Weiters können auch zwei (oder mehrere) verschiedene Nukleinsäuren als interner Standard zugesetzt werden. Bevorzugt wird der interne Standard in einer Konzentration von knapp oberhalb der Nachweisgrenze eingesetzt. Die in der EP-0 714 988-A beschriebenen Ausführungsformen können hierbei ohne weiteres für die vorliegende Erfindung adaptiert werden.

Das Antigen, das vom internen Standard gebunden (erkannt) wird, kann zu der zu bestimmenden Probe zugegeben werden (z.B. dem Antigen-Bestimmungs-Ansatz), oder aber auch bereits in der Probe in natürlicher Weise (*a priori*) vorliegen.

In Routinetests kann die Interpretation der mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltenen Resultate üblicherweise folgendermaßen erfolgen:

- i) keine Detektion des internen Standards (z.B. keine sichtbare Bande): die Bestimmung hat z.B. wegen der Amplifikationsreaktion (z.B. die PCR) nicht funktioniert; dadurch können falsch negative Resultate ausgeschlossen werden.
- ii) nur der interne Standard ist detektierbar (z.B. nur die Standard-Bande ist sichtbar): die Bestimmung inklusive der Amplifikationsreaktion (z.B. die PCR) hat funktioniert, die Probe ist negativ;
- iii) Standard- und Proben-Nukleinsäure sind detektierbar (z.B. beide Banden sind sichtbar): positive Probe.

Geeignete Reaktionsgefäße für die Immuno-PCR sollten vorzugsweise eine gute Proteinbindungskapazität zur Immobilisierung der

- 10 -

Proteine besitzen. Andererseits müssen die Gefäße für die PCR auch thermostabil sein. Für eine große Anzahl von Proben sind nicht einzelne Reaktionsgefäße, sondern Mikrotiterplatten zu bevorzugen. Polystyrol ist das am besten geeignete Material hinsichtlich Proteinbindung, jedoch werden bis jetzt keine derartigen PCR-tauglichen Platten kommerziell vertrieben. Als Ersatz können aber erfindungsgemäß beispielsweise Polycarbonatplatten verwendet werden. Denkbar ist auch der Einsatz von chemisch modifizierten Materialien zur kovalenten Bindung von Proteinen oder bereits mit Antikörpern beschichtete Materialien.

Die Beschichtung der Platten erfolgt bevorzugt über Nacht bei 4°C, es sind auch höhere Temperaturen etwa bis 37°C mit kürzerer Inkubationszeit möglich. Als Beschichtungspuffer kann beispielsweise PBS (in Phosphat gepufferte Kochsalzlösung) verwendet werden, aber auch jeder andere gängige Puffer, wie z.B. Polycarbonatpuffer.

Die Blockierung kann beispielsweise mit PBS/1% BSA (bovines Serumalbumin) durchgeführt werden. Als Ersatz kann auch jedes andere geeignete Reagens, wie z.B. Milchpulver oder vorgefertigte Blocking-Reagenzien, verwendet werden.

Die Inkubation mit dem Ligand/DNA-Komplex findet bevorzugt eine halbe Stunde bei Raumtemperatur statt, jedoch sind auch andere Zeitdauern (bevorzugt 5 min - 2 Stunden) und andere Temperaturen (bevorzugt 4° - 37°C) möglich.

Die optimalen Reaktionsbedingungen für die PCR sind in Beispiel 1 beschrieben. Es sind selbstverständlich eine Vielzahl von Veränderungen möglich (insbesondere Veränderung der Zyklenzahl, Inkubationszeiten, Temperaturprofil, Verwendung verschiedener Polymerasen, Amplifikationssysteme, Primerstrategien, etc.). Die optimalen Bedingungen können, falls z.B. das in den Beispielen verwendete Protokoll sich nicht als optimal darstellt, für die einzelnen zu bestimmenden Antigene vom Fachmann auf dem vorliegenden Gebiet ohne weiteres ermittelt werden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Überprüfung und

- 11 -

### Qualitätssicherung von biologischen Präparaten.

Die Sicherheit, insbesondere die Virussicherheit von stabilen Blutprodukten hängt im Prinzip vom Ausmaß der Kontamination von Pathogenen, insbesondere von der Viruskontamination des Ausgangsmaterials, von der Abreicherungskapazität des Verfahrens und von den spezifischen Virusaktivierungsstufen im Rahmen des Herstellungsprozesses, ab. Ein wichtiges Kriterium der Qualitätssicherung ist daher, positives Ausgangsmaterial von der Verarbeitung zu pharmazeutischen Arzneimitteln auszuschließen.

Durch die hohe Empfindlichkeit und die besonders niedrige Nachweisgrenze des erfindungsgemäßen Verfahrens können somit neue Qualitätskriterien bei biologischen Produkten festgestellt werden, welche durch einen äußerst geringen definierten bzw. fehlenden Gehalt an kontaminierenden Antigenen definiert sind.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Reagens zur Verwendung nach dem erfindungsgemäßen Verfahren, welches

- a) einen Reaktanten, der an einem Liganden gebunden ist, welcher spezifisch für das zu bestimmende Antigen ist, und
- b) einen Reaktanten als interner Standard, welcher sich vom Reaktanten aus a) in der Reaktionsweise unterscheidet, enthält.

Als unterschiedliche Reaktionsweise kommen beispielsweise unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeiten, Spezifität für andere Reaktanten, in Betracht. Als Reaktanten können Nukleinsäuren oder Enzyme verwendet werden, um beispielsweise eine kontrollierte Enzymreaktion zu erhalten. In einer bevorzugten Ausführungsform werden Nukleinsäuren als Reaktanten verwendet, die sich in einem detektierbaren Merkmal, z.B. in der Länge, unterscheiden.

Insbesondere, wenn das erfindungsgemäße Reagens bei der Detektion von modifizierten Proteinen eingesetzt wird, liegt die Ziel-Nukleinsäure bevorzugt gebunden an einem Antikörper, der spezifisch ist für das modifizierte Protein, vor.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Reagens ist die Standard-Nukleinsäure an einem Liganden gebun-

- 12 -

den, insbesondere an einem Liganden, der bereits an ein Standard-Antigen gebunden ist. Dabei kann das Standard-Antigen gleich dem zu bestimmenden Antigen sein (kompetitive Immunreaktion).

Vorzugsweise ist die Standard-Nukleinsäure im erfindungsgemäßen Reagens an einen Liganden gebunden, der spezifisch ist für ein von dem zu bestimmenden Antigen (Ziel-Antigen) unterschiedliches Antigen.

Die Liganden/DNA-Komplexe können nach der Herstellung bei -20°C oder 4°C in einem geeigneten Puffer, bevorzugt PBS, gelagert werden. Sie sind dann mehrere Monate stabil. Diese Präparation entspricht einer handelsfähigen Form. Die optimale Konzentration, mit der die Komplexe verwendet werden, liegt bei ca. 10 000 bis ca. 1 000 000 Kopien pro Vertiefung einer Mikrotiterplatte. Bevorzugterweise werden weniger als 1 Million Kopien eingesetzt, um unspezifische Bindungen in den Vertiefungen zu vermeiden. Für die Herstellung des erfindungsgemäßen Reagens können übliche Formulierungsreagenzien, wie beispielsweise Albumin als Trägerprotein, Tenside, usw. verwendet werden.

Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung auch die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Quantifizierung von Antigenen, insbesondere zur Quantifizierung von Pathogenen in Säugetier-Proben oder von Humanpathogenen in biologischen Arzneimitteln.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele und der Zeichnungsfigur, auf die sie selbstverständlich nicht eingeschränkt ist, näher erläutert.

Es zeigt:

Fig. 1 die schematische Darstellung der IMMUNO-PCR mit internem Standard.

Gemäß Fig. 1 wird eine Mikrotiterplatte mit einem Antikörper spezifisch für ein Standard-Antigen und einem Antikörper spezifisch für das zu bestimmende Antigen beschichtet. Von diesen An-

- 13 -

tikörpern wird das Standard-Antigen und das zu bestimmende Antigen gebunden. Danach werden die Liganden an die Antigene gebunden. Die Liganden bestehen aus dem jeweiligen spezifischen Antikörper für das Standardantigen, kovalent gebunden an ein Oligonukleotid (=interne Standard-Nukleinsäure, IPOS 1) und einem Antikörper spezifisch für das zu bestimmende Antigen, kovalent gebunden an ein in der Länge unterschiedliches Oligonukleotid (=Ziel-Nukleinsäure, IPO 1). Nach einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden die daraus resultierenden unterschiedlich langen Amplifikationsprodukte mittels Gelelektrophorese detektiert.

#### Beispiel 1: Zugabe eines DNA-Standards zur PCR

Während die meisten ELISAs im Prinzip sehr zuverlässig sind, kann es bei der PCR durchaus vorkommen, daß die Reaktion durch inhibitorische Substanzen gestört wird. Dies kann zu einer falsch-negativen PCR führen. Bei dem vorliegenden Experiment wurde der PCR-Teil der Immuno-PCR erfindungsgemäß durch Zugabe einer Standard-Nukleinsäure, die sich in der Länge von der Nukleinsäure des auf ein Antigen spezifischen Antikörper/Nukleinsäure-Konjugats unterscheidet, auf falsch-negative Reaktionen überprüft.

In diesem Beispiel wird als Antigen ein zelluläres (nicht infektiöses) Prionenprotein ( $\text{PrP}^c$ ) verwendet. Dieses Prionenprotein liegt nicht in gereinigter Form vor, sondern befindet sich in einem Homogenat, welches aus einem Mäusehirn gewonnen wird. Zu diesem Zweck wurde das Hirn in einem Puffer (0,1 g/ml), der aus einer 0,32 M Rohrzuckerlösung, 0,5% Desoxycholat und 0,5% NP-40 besteht, in einem Dounce homogenisiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (15 min bei 4500 Upm) wurde das Pellet verworfen und dann die Proteinmenge im Überstand bestimmt.

Nach Bestimmung der Protein-Konzentration wurden verschiedene Mengen des Homogenats in 2 gleichen Ansätzen (2x unbeschichtet, 2x 8 µg, 2x 800 ng) in Polycarbonatplatten (96 Vertiefungen, V-förmig von MJ Research, Watertown, Mass., USA) über Nacht in einem Volumen von 50 µl bei 4°C inkubiert. Nach dieser Beschichtung wurden die entsprechenden Vertiefungen 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 50 µl einer PBS/1% BSA-Lösung blockiert. An-

- 14 -

schließend wurde eine halbe Stunde mit ca. 10<sup>4</sup> Kopien des Prion-antikörper/DNA-Komplexes (Ziel-Nukleinsäure, 6H4-IPO1; s. Tabelle 1) in 50 µl PBS/0,1% inkubiert. Es wurde 6 x mit 100 µl PBS gewaschen und dann die PCR-Lösung direkt zu den entsprechenden Vertiefungen dazugegeben. Die PCR-Lösung (50 µl) enthielt 1 E der Polymerase AmpliTaq Gold™ (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA), 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,001% Gelatine, 200 µM von jedem dNTP und jeweils 500 ng der entsprechenden Primer IP1/IP2 (s. Tabelle 1). Die Proben wurden mit 50 µl Mineralöl überschichtet und zunächst 14 min bei 94°C zur Aktivierung der Polymerase inkubiert. Dann wurde 40 Zyklen nach folgendem Profil in einem PTC0200-Thermocycler (MJ Research) amplifiziert: 30 s bei 94°C, 30 s bei 55°C, 60 s bei 72°C mit einem abschließenden Elongationsschritt bei 72°C für 60 s. Zu den Proben, die auf falsch-negative Resultate überprüft wurden, wurden zu einem Ansatz ca. 100 und zum anderen ca. 1000 Kopien der internen Standard-Nukleinsäure IPOS1 (s. Tabelle 2) dazugegeben.

8 µl des jeweiligen Probenansatzes wurden auf ein 3,5% "low-melting" Agarosegel aufgetragen. In der Tabelle 2 wird das Ergebnis des Versuchs dargestellt. Es zeigt sich, daß in den Vertiefungen, in denen sich kein Homogenat befindet, nur der Standard IPOS1 zu sehen ist, d.h. es befindet sich kein spezifisches Antigen in dieser Probe. Die Reaktion war jedoch auf keinen Fall falsch-negativ. Durch die Zugabe von verschiedenen Mengen von IPOS1 kann man auch eine Kompetition mit der Ziel-Nukleinsäure IPO1 erkennen, d.h. 1000 Kopien ergeben eine stärkere Bande als 100 Kopien. Der Standard sollte aus diesem Grund nur knapp über der Nachweisgrenze eingesetzt werden, um ein Wegkompetitieren des spezifischen Signals zu verhindern. Bei größeren Mengen von spezifischem Antigen könnte es durchaus vorkommen, daß nur die IPO1-Bande zu erkennen ist. Dies ist durchaus im Sinne der Erfindung, da vorrangig falsch-negative Reaktionen verhindert werden sollen.

Tabelle 1. Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide und Primer.

IPOS1        5'-AGAACCCACT GCTTACTGGC CTTATCGAAA  
                  TTAATACGAC TCACTATAAGG GAGACCCAAG CTTGGTACCG  
                  AGCTCGGATG TGCCTTCTAG TTGCCAGCC -3'

- 15 -

IPO1        5' -AGAACCCACT GCTTACTGGC CTTATCGAAA  
               TTAATACGAC TTGGTACCG AGCTCGGATG TGCCTTCTAG  
               TTGCCAGCC -3'

IP1        5' -AGAACCCACT GCTTACTGGC -3'  
  IP2        5' -GGCTGGCAAC TAGAAGGCAC -3'

Die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden mit Hirnhomogenat beschichtet, blockiert und mit 6H4-IPO1 inkubiert. Nach 6-maligen Waschen wurde nach Zugabe von internem DNA-Standard amplifiziert. Die negative Kontrolle der PCR-Reaktion war negativ, die positiven Kontrollen der beiden verwendeten DNA-Reagenzien (DNA-Standard, 6H4-IPO1) waren positiv. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.

Bei den Proben 1-6 wurden 1000 Kopien der Standard-Nukleinsäure IPOS1, bei den Proben 7-12 wurden 100 Kopien IPOS1 dazugegeben. Beschichtet wurde entweder mit 8 oder 0,8 µg Homogenat.

Tabelle 2: Kontrollierte Bestimmung von Prionantigen in einem Mäusehirnhomogenat

Probe	Homogenat in µg	IPOS1 zugegebene Kopien	Banden		
			IPO1	IPO1	IPOS1
1	-	1000	-	-	++
2	-	1000	-	-	++
3	8	1000	+	+	++
4	8	1000	+	+	++
5	0,8	1000	+	+	++
6	0,8	1000	+	+	++
7	-	100	-	-	+
8	-	100	-	-	+
9	8	100	+	+	+
10	8	100	+	+	+
11	0,8	100	+	+	+
12	0,8	100	+	+	+

Erklärung der Zeichen: + = Bande, ++ = starke Bande,  
                           - = keine Bande.

**Zugabe des Markerantigens:**

Wenn die gesamte Immuno-PCR auf falsch-negative Reaktionen überprüft werden soll, wird nicht zur PCR eine Standard-Nukleinsäure dazugegeben, sondern es wird am Anfang des Experiments als interner Standard ein Markerantigen in einer Menge, die gerade noch bestimmt werden kann, gleichzeitig mit dem spezifischen Antigen auf die entsprechenden Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Damit ist gewährleistet, daß alle störenden Einflüsse, die zu einer falsch-negativen Reaktion (dazu gehört zum Beispiel auch das versehentliche Nichtbeschichten einer Vertiefung) führen könnten, mitkontrolliert werden. Bei der Inkubation mit dem spezifischen Antikörper/DNA-Komplexes wird dann mit einem entsprechenden Standard-Antikörper/DNA-Komplex gleichzeitig inkubiert und im Anschluß mit dem gleichen Primerpaar amplifiziert.

Falls die Immuno-PCR auf einem sogenannten Sandwich-ELISA basiert, müssen die Vertiefungen der Mikrotiterplatte dementsprechend mit einem Antikörper für das zu detektierende Antigen und einem Antikörper für das Standard-Antigen beschichtet werden. Es kann auch vorkommen, daß das Standard-Antigen natürlich vorkommt, wie beispielsweise bestimmte Proteine (z.B. Protein C) bei der Verwendung von biologischen Flüssigkeiten, wie z.B. Plasma.

**Beispiel 2: Herstellung und Verwendung der Antikörper/DNA-Komplexe**

Die Herstellung eines Antikörper/DNA-Konjugates durch kovalente Bindung eines Oligonukleotides an einem monoklonalen anti-Prionen-Antikörper erfolgte entsprechend Hendricksson et al. Als Ausgangsmaterial zur Herstellung des Konjugates wurde ein amino-modifiziertes Reporter-Oligonukleotid (IPO1, hergestellt von Fa. Metabion, Martinsried, Deutschland) sowie der monoklonale anti-Prionen-Antikörper 6H4 (Prionix, Basel, Schweiz) verwendet.

**Schritt 1: Herstellung der Acetylthioacetyl-derivatisierten DNA**

- 17 -

Die Herstellung der Acetylthioacetyl-derivatisierten DNA erfolgt durch Reaktion mit Succinimidyl-S-Acetylthioacetat (SATA-Reagens/Pierce, Rockford, IL, USA).

Dazu wurden zu 20 µl einer Lösung des IPO1-Oligonukleotids in H<sub>2</sub>O (Konzentration: 0,5 µg/ml) jeweils 2,3 µl eines Natriumcarbonat-Puffers (300 mM, pH 9,0) sowie einer Lösung von 115 mM SATA in DMF gegeben und über 30 Minuten bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurde über eine HiTrap™-Säule (1,6 x 2,5 cm, Sephadex G-25 superfine/Pharmacia, Uppsala, Schweden) unter Verwendung eines FPLC-Systems (Fa. Pharmacia) umgepuffert. Als Elutionspuffer wurde ein 100 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 6,5 verwendet.

**Schritt 2: Herstellung des Maleimid-modifizierten Antikörpers**

Zu 90 µl eines 100 mM Natriumphosphat-Puffers, pH 7,0 wurden 12,5 µl einer Lösung des 6H4-Antikörpers (Konzentration: 2 mg/ml) gegeben. Diese Lösung wurde in einer Slide-A-Lyzer Dialyse-Kassette (10.000 MWCO, Probevolumen: 0,1 - 0,5 ml/Pierce, Rockford, IL, USA) über Nacht bei einer Temperatur von +4°C gegen 100 mM Natriumphosphat-Puffers, pH 7,0 dialysiert. Dazu wurden dann 15 µl einer wäßrigen Lösung von Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat (Sulfo-SMCC/Fa. Pierce) gegeben (Konzentrationen: 2,75 mM Sulfo-SMCC, 100 mM Natriumphosphat, 1,5 % DMF, pH 7,0). Nach Inkubation über 30 Minuten bei Raumtemperatur und unter leichtem Schütteln wurde wie unter Schritt 1 beschrieben über eine HiTrap™-Säule (1,6 x 2,5 cm) umgepuffert.

**Schritt 3: Herstellung und Reinigung des DNA-Antikörperkonjugates**

Zur Herstellung des Antikörper/DNA-Konjugates wurden die unter Schritt 1 und Schritt 2 hergestellten Derivate vereinigt (jeweils ca. 1,5 ml Lösung der Acetylthioacetyl-derivatisierter DNA bzw. des Maleimid-modifizierten Antikörpers).

- 18 -

Nach Start der Kupplungsreaktion durch Zugabe von 2  $\mu$ l einer 1 M wässrigen Hydroxylaminhydrochlorid-Lösung, pH 7,0, enthaltend 50 mM EDTA, wurde über 2 Stunden bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß und leichtem Schütteln inkubiert. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 2  $\mu$ l einer 10 mM Lösung von N-Ethylmaleimid (Fa. Pierce) in DMF abgestoppt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Hilfe eines Centricon 3-Konzentrators (Amicon, Beverly, MA, USA) durch Zentrifugation bei 7000 x g aufkonzentriert.

Das aufkonzentrierte Reaktionsgemisch (ca. 500 $\mu$ l) wurde anschließend durch Gelfiltration mit Hilfe des Pharmacia FPLC-Systems nachgereinigt (Pharmacia, Uppsala, Schweden).

Chromatographische Bedingungen:

Säule: XK 16mm/120mm, gefüllt mit Sephadex 300 HR  
(Fa. Pharmacia)

Elutionspuffer: 200 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,0

Flußrate: 0,5 ml/min

Detektion: 280 nm

Fraktionsgröße: 0,25 ml

Die Fraktionen im Elutionsmaximum wurden gesammelt und für die Immuno-PCR in verschiedenen Verdünnungen eingesetzt.

## P a t e n t a n s p r ü c h e :

1. Verfahren zur Bestimmung von Antigenen in einer Probe durch Amplifizieren einer Nukleinsäure, die an einen für die Antigene spezifischen Liganden gebunden ist, dadurch gekennzeichnet, daß die Bestimmung in Anwesenheit mindestens eines internen Standards durchgeführt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine an einen Liganden gebundene Nukleinsäure als interner Standard eingesetzt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der interne Standard eine Standard-Nukleinsäure enthält, welche sich von der Nukleinsäure, mit welcher das Antigen bestimmt wird, zumindest in einem detektierbaren Merkmal unterscheidet.
4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand der Standard-Nukleinsäure vom Liganden, der an das zu detektierende Antigen bindet, verschieden ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Antigene in einer Probe von einer Körperflüssigkeit eines Säugetieres bestimmt werden.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Antigene in einer Probe eines Materials, ausgesucht aus der Gruppe von Blut, Plasma, einer Plasmafraktion, einer Blutzellenfraktion und einer Präparation eines gereinigten plasmatischen Proteins, bestimmt werden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Antigene in einer Probe einer Zellkultur bestimmt werden.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß als Antigene modifizierte Proteine bestimmt werden, wie z.B. Prionen, insbesondere Erreger von BSE oder CJD oder andere Erreger von TSE.

- 20 -

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die modifizierten Proteine durch induzierte Konformationsänderung enthalten sind.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß Antikörper, insbesondere monoklonale Antikörper, als Liganden verwendet werden.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure kovalent an den Liganden gebunden ist.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure über hochaffine Liganden an den Liganden gebunden ist.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Standard-Nukleinsäure an einen Liganden gebunden ist, welcher sich von dem für das zu bestimmende Antigen spezifischen Liganden unterscheidet.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß mit dem internen Standard ein Standard-Antigen detektiert wird.

15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß das Standard-Antigen vor bzw. gleichzeitig mit der Probe dem Antigen-Bestimmungs-Ansatz zugesetzt wird.

16. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß das Standard-Antigen bereits natürlich in der Probe vorhanden ist.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Standard-Nukleinsäure an den für das zu bestimmende Antigen spezifischen Liganden gebunden ist.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure durch die Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert wird.

- 21 -

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Standard-Nukleinsäure und die Nukleinsäure, die an einen spezifischen Liganden für die zu bestimmenden Antigene gebunden ist, mit den gleichen Mitteln zur Amplifizierung behandelt werden, insbesondere mit den gleichen Primern.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß sich die Standard-Nukleinsäure von der Nukleinsäure, die an einen spezifischen Liganden für die zu bestimmenden Antigene gebunden ist, durch die unterschiedliche Länge unterscheidet.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß der interne Standard in einer Konzentration von knapp oberhalb der Nachweisgrenze eingesetzt wird.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens zwei verschiedene Standard-Nukleinsäuren als interner Standard eingesetzt werden.

23. Reagens zur Verwendung in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 22, enthaltend  
a) einen Reaktanten, der an einen Liganden gebunden ist, welcher spezifisch für das zu bestimmende Antigen ist, und  
b) einen Reaktanten als interner Standard, welcher sich von dem Reaktanten aus a) in der Reaktionsweise unterscheidet.

24. Reagens nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktanten Nukleinsäuren sind und sich die Nukleinsäure aus b) zumindest in einem detektierbaren Merkmal von der Nukleinsäure aus a) unterscheidet.

25. Reagens zur Verwendung in einem Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, welches eine Nukleinsäure gebunden an einen Antikörper enthält, welcher Antikörper spezifisch ist für die modifizierten Proteine.

26. Reagens nach Anspruch 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, daß als interner Standard eine Standard-Nukleinsäure an einen

- 22 -

Liganden gebunden, enthalten ist, welcher weiters an ein Standard-Antigen gebunden ist.

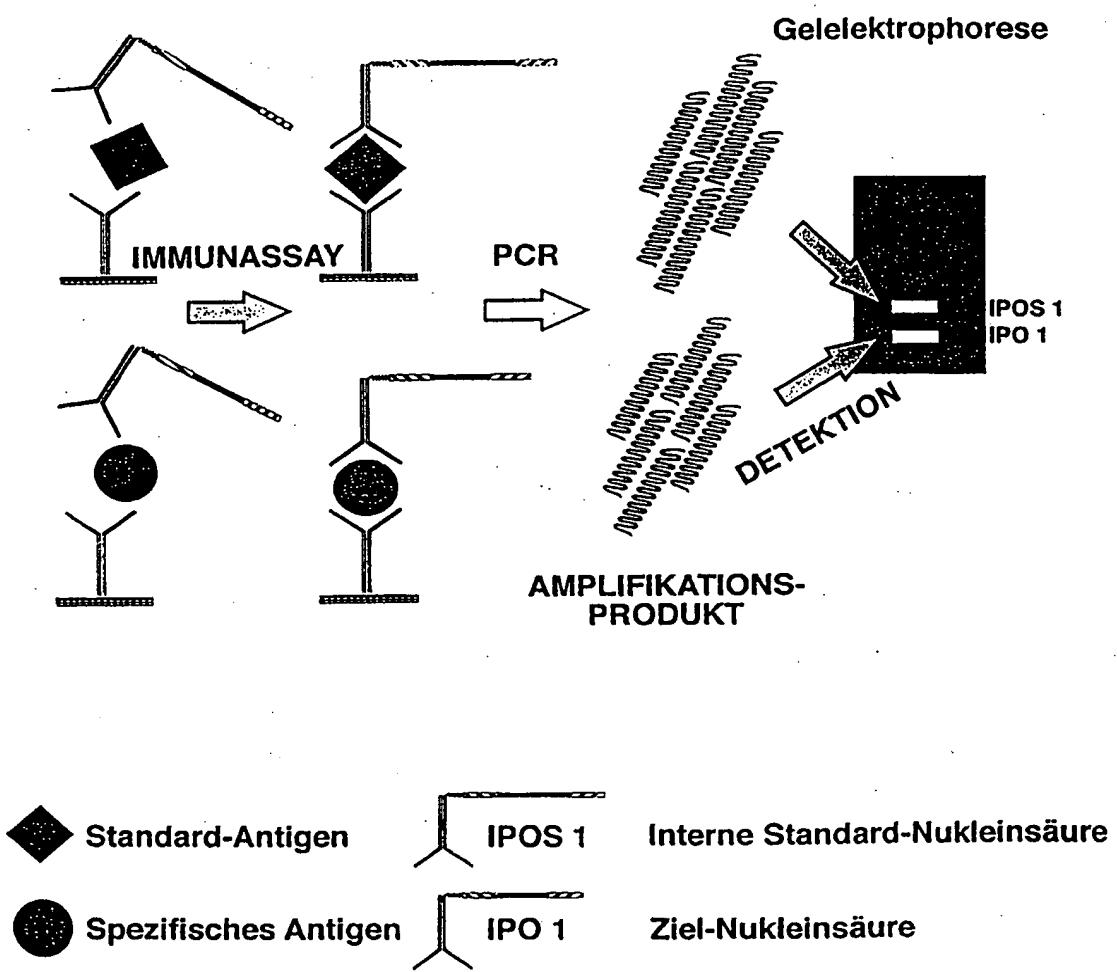
27. Reagens nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß das Standard-Antigen gleich ist mit dem zu bestimmenden Antigen.

28. Reagens nach einem der Ansprüche 23 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß als interner Standard eine Standard-Nukleinsäure an einen Liganden gebunden, enthalten ist, welcher spezifisch ist für ein von dem zu bestimmenden Antigen unterschiedliches Antigen.

29. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 22, zur Quantifizierung von Antigenen eines Pathogens in einer Probe eines Säugetieres.

30. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 22, zur Quantifizierung von Antigenen eines Humanpathogens in einem biologischen Arzneimittel.

FIG. 1



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intr 'lional Application No  
PCT/AT 99/00139

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C12Q1/68 G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5 665 539 A (SMITH CASSANDRA L ET AL) 9 September 1997 (1997-09-09) the whole document ---	1-30
Y	SANO T ET AL: "Deoxyribonucleic acids as unique markers in molecular detection" GENETIC ANALYSIS: BIOMOLECULAR ENGINEERING, vol. 14, no. 2, 1 July 1997 (1997-07-01), page 37-40 XP004126263 ISSN: 1050-3862 the whole document ---	1-30
Y	WO 98 22624 A (UNIV PENNSYLVANIA) 28 May 1998 (1998-05-28) the whole document ---	1-30 -/-



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

6 October 1999

13/10/1999

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Osborne, H

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/AT 99/00139

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 714 988 A (IMMUNO AG) 5 June 1996 (1996-06-05) the whole document ----	1-30
Y	EP 0 586 112 A (PHARMA GEN S A) 9 March 1994 (1994-03-09) the whole document ----	1-30
Y	WO 94 04706 A (AKZO NV ;KIEVITS TIM (NL); LENS PETER FRANKLIN (NL)) 3 March 1994 (1994-03-03) the whole document ----	1-30
A	WO 97 00446 A (LANDEGREN ULF) 3 January 1997 (1997-01-03) the whole document ----	1-30
A	WOLFHAGEN M J H M ET AL: "RAPID DETECTION OF TOXIGENIC CLOSTRIDIUM DIFFICILE IN FECAL SAMPLES BY MAGNETIC IMMUNO PCR ASSAY" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 32, no. 7, July 1994 (1994-07), pages 1629-1633, XP002913954 ISSN: 0095-1137 -----	1-30

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

Inte	lational Application No
	PCT/AT 99/00139

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5665539	A	09-09-1997	US 5328985 A		12-07-1994
WO 9822624	A	28-05-1998	AU 5447298 A		10-06-1998
EP 0714988	A	05-06-1996	AT 401062 B AT 183194 A CA 2159044 A JP 8107798 A US 5789153 A AT 224594 A		25-06-1996 15-10-1995 27-03-1996 30-04-1996 04-08-1998 15-10-1997
EP 0586112	A	09-03-1994	JP 7087978 A		04-04-1995
WO 9404706	A	03-03-1994	AT 162226 T AU 685396 B AU 4951393 A CA 2143202 A DE 69316372 D DE 69316372 T EP 0656955 A ES 2114066 T FI 950836 A GR 3026631 T JP 8500732 T US 5770360 A ZA 9306015 A		15-01-1998 22-01-1998 15-03-1994 03-03-1994 19-02-1998 27-08-1998 14-06-1995 16-05-1998 23-02-1995 31-07-1998 30-01-1996 23-06-1998 10-03-1994
WO 9700446	A	03-01-1997	SE 504798 C AU 702125 B AU 6143996 A CA 2224674 A EP 0832431 A JP 11508040 T SE 9502196 A		28-04-1997 11-02-1999 15-01-1997 03-01-1997 01-04-1998 13-07-1999 17-12-1996

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Internationales Aktenzeichen
PCT/AT 99/00139

**A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 6 C12Q1/68 G01N33/53

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole )  
IPK 6 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	US 5 665 539 A (SMITH CASSANDRA L ET AL) 9. September 1997 (1997-09-09) das ganze Dokument ---	1-30
Y	SANO T ET AL: "Deoxyribonucleic acids as unique markers in molecular detection" GENETIC ANALYSIS: BIOMOLECULAR ENGINEERING, Bd. 14, Nr. 2, 1. Juli 1997 (1997-07-01), Seite 37-40 XP004126263 ISSN: 1050-3862 das ganze Dokument ---	1-30
Y	WO 98 22624 A (UNIV PENNSYLVANIA) 28. Mai 1998 (1998-05-28) das ganze Dokument ---	1-30 -/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonderem bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "a" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche	Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts
6. Oktober 1999	13/10/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Osborne, H
---	---

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

 Internationales Aktenzeichen  
**PCT/AT 99/00139**

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5665539 A	09-09-1997	US	5328985 A	12-07-1994
WO 9822624 A	28-05-1998	AU	5447298 A	10-06-1998
EP 0714988 A	05-06-1996	AT	401062 B	25-06-1996
		AT	183194 A	15-10-1995
		CA	2159044 A	27-03-1996
		JP	8107798 A	30-04-1996
		US	5789153 A	04-08-1998
		AT	224594 A	15-10-1997
EP 0586112 A	09-03-1994	JP	7087978 A	04-04-1995
WO 9404706 A	03-03-1994	AT	162226 T	15-01-1998
		AU	685396 B	22-01-1998
		AU	4951393 A	15-03-1994
		CA	2143202 A	03-03-1994
		DE	69316372 D	19-02-1998
		DE	69316372 T	27-08-1998
		EP	0656955 A	14-06-1995
		ES	2114066 T	16-05-1998
		FI	950836 A	23-02-1995
		GR	3026631 T	31-07-1998
		JP	8500732 T	30-01-1996
		US	5770360 A	23-06-1998
		ZA	9306015 A	10-03-1994
WO 9700446 A	03-01-1997	SE	504798 C	28-04-1997
		AU	702125 B	11-02-1999
		AU	6143996 A	15-01-1997
		CA	2224674 A	03-01-1997
		EP	0832431 A	01-04-1998
		JP	11508040 T	13-07-1999
		SE	9502196 A	17-12-1996